

# 일부 식물성오일의 *Streptococcus mutans*와 *Lactobacillus casei* 성장에 미치는 영향

김세연<sup>1</sup>, 김한나<sup>3</sup>, 전은주<sup>1</sup>, 김진범<sup>1</sup>, 정승화<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>부산대학교 치의학전문대학원 예방치과학교실, <sup>2</sup>부산대학교 중개치의학연구소, <sup>3</sup>청주대학교 보건의료대학 치위생학과

## The growth inhibitory effect of some vegetable oils on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus casei*

Se-Yeon Kim<sup>1</sup>, Han-Na Kim<sup>3</sup>, Eun-Joo Jun<sup>1</sup>, Jin-Bom Kim<sup>1</sup>, Seung-Hwa Jeong<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Preventive and Community Dentistry, <sup>2</sup>Institute of Translational Dental Sciences, Pusan National University School of Dentistry, Yangsan, <sup>3</sup>Department of Dental Hygiene, College of Health Sciences, Cheongju University, Cheongju, Korea

**Received:** October 22, 2015

**Revised:** January 30, 2016

**Accepted:** February 18, 2016

**Corresponding Author:** Seung-Hwa Jeong  
Department of Preventive and Community  
Dentistry, Pusan National University  
School of Dentistry, Busandaehak-ro 49,  
Meulgeum-up, Yangsan 50612, Korea  
Tel: +82-51-510-8222  
Fax: +82-51-510-8221  
E-mail: jsh0917@pusan.ac.kr

\*This research was supported by Basic  
Science Research Program through  
the National Research Foundation of  
Korea (NRF) funded by the Ministry of  
Science, ICT & Future Planning (No.  
2014R1A1A1005924).

**Objectives:** The purpose of this study was to evaluate the growth inhibitory effects of some vegetable oils on *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) and *Lactobacillus casei* (*L. casei*).

**Methods:** Two bacterial strains and 5 kinds of test solutions (3 experimental groups: orange essential oil, olive oil, soybean oil; 1 positive control group: chlorhexidine solution; 1 negative control group: broth medium) were used in this study. *S. mutans* and *L. casei* pellets were exposed to 1 ml of one of the test solutions for 1 minute. Then, the treated bacterial cells were incubated in fresh broth medium for 0, 4, 8, 16, and 24 hours. The optical density of the broth medium was measured using an ELISA reader at 620 nm. A nonparametric Kruskal-Wallis test (with Mann-Whitney U tests) was performed to compare the change in optical density between different groups at different time points.

**Results:** Bacterial growth was significantly inhibited in all experimental groups compared to the negative control group. The growth of *L. casei* was less affected by experimental oils than that of *S. mutans*. Orange essential oil had the maximum growth inhibitory effect on *S. mutans* up to 8 hours, similar to that in the positive control group ( $P < 0.01$ ). Experimental oils had greater growth inhibitory effect on *L. casei* than chlorhexidine solution.

**Conclusions:** This in vitro study confirmed the growth inhibitory effect of some vegetable oils on *S. mutans* and *L. casei*. Rinsing of the mouth using these vegetable oils is expected to have an anti-plaque effect, but additional clinical studies are needed to confirm this.

**Key Words:** Essential oil, Growth inhibitory effect, *Lactobacillus casei*, Mouth rinse, *Streptococcus mutans*, Vegetable oil

## 서론

치면세균막은 구강 내에 치아와 같은 경조직 위의 획득 피막에 다양한 균이 부착되어 축적된 세균복합체 막이다<sup>1)</sup>. 치면세균막은 구강 내 환경변화에도 서로 상호작용하며 항상성을 유지할 수

있지만, 외인성 병원균이 더욱 우세해지면 치아우식증, 치주질환과 같은 구강 질병이 발생하게 된다. 치아우식증과 관련된 대표적인 균에는 *Streptococcus mutans*와 *Lactobacilli species*<sup>2)</sup>, 치주질환과 관련된 대표적인 균에는 *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* 등<sup>3)</sup>이 알려져 있

으며, 이러한 구강 질병은 치면세균막의 세균의 양과 비례한다<sup>4,5)</sup>. 따라서 치아우식증과 치주질환을 예방하기 위해서는 치면세균막을 물리, 화학적으로 제거하거나 치면세균막 내의 세균의 성장을 억제시켜줘야 한다.

치면세균막을 제거하는 방법으로는 물리적 방법과 화학적 방법이 있다. 화학적 방법으로는 클로르헥시딘(Chlorhexidine)이 대표적으로, 구강 내 그람양성균, 그람음성균 모두의 활성을 억제하여 세균 수를 줄이는 데 효과적이다. 하지만 맛이 좋지 못하고, 치아에 착색 및 점막의 통증을 일으키는 등의 부작용이 있으므로 구강병 예방이나 구강 미생물의 활성 억제를 위한 지속적인 목적으로는 장기간 사용할 수가 없다<sup>6)</sup>. 따라서 미생물의 성장과 치면세균막 형성을 억제시킬 수 있는 천연물에서 추출한 항균물질 활용에 대한 관심이 높아지고 있다<sup>7)</sup>. 대표적으로 자일리톨과 잔톨리졸은 치면세균막 구성균주의 성장 억제에 효과적인 것으로 알려져 있고<sup>8,9)</sup>. 이외에 치면세균막 구성균주의 성장 및 억제를 목적으로 천연항균물질인 에센셜오일을 이용한 항균에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다<sup>10-12)</sup>.

에센셜오일(Essential oil)이란 향기가 나는 식물에서 물리적인 방법(증류법, 냉압착법, 용매추출법, 냉침법, SC-CO<sub>2</sub> 추출법 등)으로 추출한 휘발성 물질을 말한다<sup>13)</sup>. 이러한 에센셜오일은 고대로부터 오랫동안 사용되어 왔고, 주로 방향제·화장품·향수·비누·세제·향신료 등으로 이용되고 있다. 잎·나무·뿌리 등의 에센셜오일 성분은 식물에 기생하는 생물이나 외부 동물로부터 자신을 방어하는 수단으로 사용된다<sup>14)</sup>. Lee 등<sup>11)</sup>은 구강 내 세균에 대한 에센셜오일의 항균효과에 관한 연구로 5가지 에센셜오일의 농도를 1/2 씩 희석하며 항균능력을 평가하였으며, Takarada 등<sup>12)</sup>은 마누카오일(manuka oil)과 티트리오일(tea tree oil)의 강력한 항균력을 보고하였다.

최근 에센셜오일과 유사한 식용 가능한 식물성오일을 이용한 건강 유지 방법으로 오일풀링(Oil pulling)에 대한 대중의 관심이 높아진 바 있다<sup>14)</sup>. 오일풀링은 인도의학서 ‘아유르베다(Ayurveda)’에도 실린 전통적인 의술로서 건강을 위해 고대에서부터 전해져 오는 방법으로, 매일 아침 참깨 또는 코코넛과 같은 식물성오일을 한 스푼 입에 머금고 가글을 통해 구강 내에 있는 세균과 입안의 독소를 오일과 함께 제거하여 면역을 강화시키는 전통적인 디톡스 민간요법이다<sup>14,15)</sup>. 이 때 사용하는 식물성오일은 식물의 씨나 열매에서 냉압착 하여 추출한 오일이며, 이 오일을 사용했을 때 효과가 극대화된다고 보고하였다<sup>15)</sup>. Asokan 등<sup>16)</sup>은 Dentocult SM

strip을 이용하여 식물성오일의 구강내 항균 효과를 확인한 결과 식물성오일은 *Streptococcus mutans*에 대하여 효과가 있었으나 클로르헥시딘 보다 항균 효과가 강하게 나타나지 않았다고 보고하였다. 다양한 에센셜오일의 항균<sup>11,12)</sup>, 항염증<sup>17)</sup>, 항진균<sup>18)</sup>, 항암효과<sup>19)</sup> 등에 대해서는 다수의 연구에서 보고되었으나, 식용 가능한 식물성오일에 대한 실험실 상에서의 연구에 대한 보고는 많지 않다.

따라서 본 연구의 목적은 구강 내에서 당을 분해하고 활발하게 산을 생산하여 치아우식을 유발하는 균으로 알려진 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)와 치아우식의 2차 진행에 관여하는 *Lactobacillus casei* (*L. casei*)에 대하여 식물성오일이 균 성장에 영향을 미치는지를 평가하고 기존 구강양치용액과 비교하고자 하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 연구 재료

#### 1.1. 실험균주

본 실험에 사용된 균주는 한국생명공학연구원 생명자원센터에서 분양 받은 *S. mutans* KCTC3065와 *L. casei* KCTC3109이다. 균을 배양하기 위하여 사용된 배지는 한국생명공학연구원 생명자원센터에서 추천하는 배지로, *S. mutans*는 Brain Heart Infusion (Bacto BHI, BD, USA), *L. casei*는 Lactobacilli MRS (Difco MRS, BD, USA)를 사용하였다.

분양 받은 균주는 동결건조 상태로 앰플에 보관되어 있었으며, 300-400  $\mu$ l의 액체배지를 첨가하고 골고루 현탁하여 고체 평판 배지에 옮긴 뒤, 활성 확인을 위해 37°C에서 48시간 배양하였다. 순수 배양된 균주의 colony를 액체 배지에서 배양하여 배양된 균액과 100% glycerol의 비율을 4:1로 맞춰 초저온 냉동고(-76°C)에서 동결 보존하였다. 동결 보존된 균주의 활성을 위해 초저온 냉동고에서 꺼낸 후 실온에서 액체상태로 녹인 뒤, 1 ml의 액체배지에 넣어 24 시간 배양하였으며, 활성된 균주의 용액을 4 ml의 액체배지에 넣어 24 시간, 2차 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

#### 1.2. 실험대상용액

본 연구에서는 각 실험 균주의 성장에 미치는 영향을 평가하기 위하여 음성, 양성대조균을 포함한 총 5가지의 실험용액을 비교하였다. 음성대조균은 액체배지(NC)를 사용하였고, 양성대조균

Table 1. Test solution of this study

Experimental Groups	Test solution
Negative control	Brain Heart Infusion broth (Bacto BHI, BD, USA) for <i>S. mutans</i> Lactobacilli MRS (Difco MRS, BD, USA) for <i>L. casei</i>
Positive control	Chlorhexidine solution (Hexamedine, Bukwang co., KOR)
Experimental solution 1	Olive oil (100% of Spanish Extra virgin olive oil, CJ co., KOR)
Experimental solution 2	Orange Essential oil (Sweet Orange, Euro Aroma, DEU)
Experimental solution 3	Soybean oil (Handmade in domestic soybean oil, CJ co., KOR)

은 시판되는 구강양치용액인 클로르헥시딘 용액(CHx)을 사용하였다. 식용 시판 올리브오일(OO), 에센셜오일 중 냉압착 추출방법을 사용하는 오렌지오일(OEO), 식용 시판 콩기름(SO)을 사용하였다(Table 1).

## 2. 연구 방법

### 2.1. 실험대상용액의 처리

액체배지와 균체 분리를 위해 *S. mutans*와 *L. casei*의 배양액을 4분 동안 8,000 rpm에서 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 *S. mutans*와 *L. casei*의 tube에 각 실험대상용액을 1 ml씩 넣어 1분간 처리하였다. 충분히 현탁된 실험대상용액에서 균체 분리를 위해 원심분리한 뒤, 처리한 실험대상용액을 제거 하였다. 마지막으로 잔여 처리용액을 제거하기 위해 액체배지로 1분 동안 세척한 후 신선한 배지로 교체하기 위해 원심분리해 주고 신선한 배지로 교체하였다.

### 2.2. 실험대상용액별 균의 흡광도 값 평가

각 시간에서 성장정도를 평가하기 위해 처치군 별 샘플을 준비하였다. 한 샘플에는 990  $\mu$ L의 액체배지에 실험대상용액을 처리한 균체 10  $\mu$ L를 접종하였으며, 각 시간 별(0, 4, 8, 16, 24 시간) 3개의 샘플을 용액 별로 총 15개 준비하였다. 37°C의 배양기에서 배양하였다. 0, 4, 8, 16, 24 시간에 배양기에서 꺼내어 충분히 교반한 후 96 well plate에 100  $\mu$ L씩 분주한 뒤, 실험대상용액별 흡광도 값 평가를 위해 96 well plate는 흡광도 측정기(ELISA Reader, Tecan, AUT)로 620 nm의 파장에서 측정하였다. 각 측정

시점에서의 흡광도 결과는 동일 실험군의 0시간에 측정된 흡광도 값을 뺀 보정된 값을 분석에 활용하였다(Fig. 1).

## 3. 결과 분석

각 실험군에서 5번의 측정 시점 간의 흡광도의 통계적인 차이 여부를 확인하기 위하여 비모수 검정법인 Kruskal-Wallis test와 사후분석으로 유의수준이 보정된 Mann-Whitney U test를 적용하였다. 또한 각 측정 시점에서 실험군 간의 흡광도의 차이를 확인하기 위해 동일한 비모수 검정법을 적용하였다. 본 연구의 통계 분석은 IBM SPSS® 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였으며, 유의수준은 5%로 설정하였다.

## 연구성적

### 1. *S. mutans*에 대한 실험용액 처리 후 성장 영향

미처치군인 음성대조군(NC)에서는 시간이 증가함에 따라 흡광도 측정값이 점점 증가하여 대수증식기를 거쳐 8시간에 흡광도 측정값의 최고값을 나타냈다( $P < 0.001$ ).

양성대조군인 클로르헥시딘용액(CHx) 처치군에서는 Kruskal Wallis test 결과, 비록 각 시간 간 흡광도의 미세한 차이가 관찰되었지만( $P=0.048$ ), 사후분석에서는 어떤 집단 간에도 차이가 관찰되지 않은 것으로 보아 *S. mutans*의 성장이 지속적으로 억제되었다.

오렌지에센셜오일(OEO) 처치군에서는 처치 후 8시간까지도 흡광도 측정값(0.00)의 변화가 없다가 16시간 후 측정시점부터 흡광도(0.22)가 증가하기 시작하여 24시간에서도 계속 성장하는 양

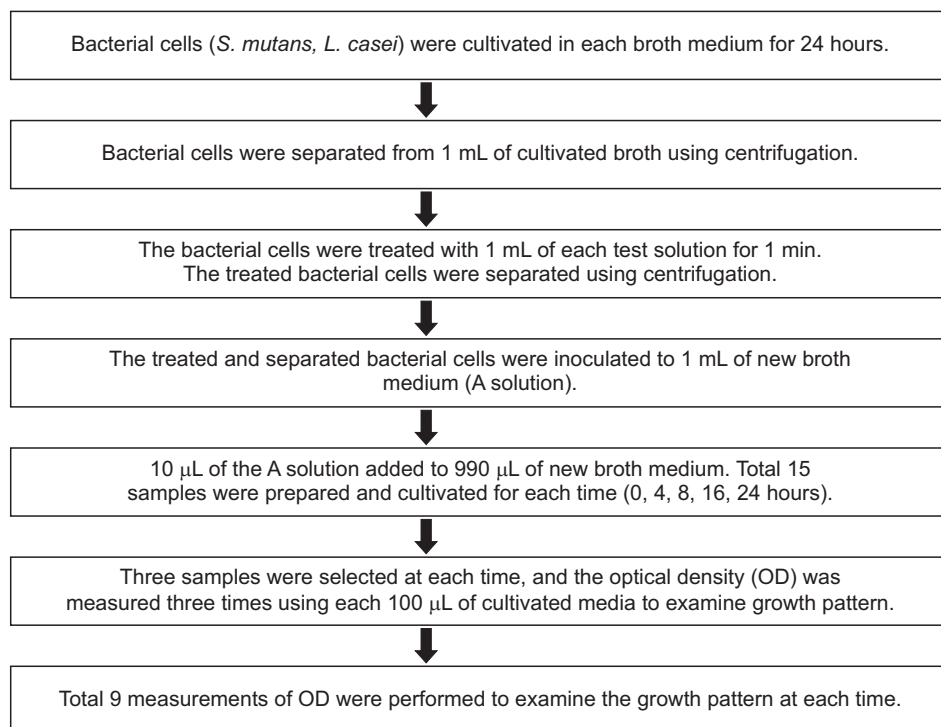


Fig. 1. experimental procedure for measurement of optical density.

상을 나타냈다( $P<0.001$ ). 콩기름(SO) 처치군에서는 처치 후 4시간까지 흡광도의 변화가 없다가, 8시간 후 측정시점부터 흡광도(0.06)가 증가하기 시작하여 16시간에 최대 흡광도(0.26)를 나타낸 후, 24시간 후에는 흡광도(0.23)가 감소하였다( $P<0.001$ ). 올리브오일(OO) 처치군에서는 처치 직후(0.00)와 비교하여 4시간 측정시점(0.01)부터 흡광도의 통계적인 차이가 4시간부터 관찰되고 8시간 후(0.18)에는 흡광도가 급격히 증가하였다( $P<0.001$ ).

각 실험용액 처리 후 4시간 시점에서 흡광도 비교결과, 오렌지 에센셜오일 처치군과 콩기름 처치군은 양성대조군인 클로르헥시딘 처치군과 동일한 성장억제양상을 나타냈다( $P<0.001$ ). 처치 후 8시간 시점에서는 오렌지 에센셜오일 처치군만이 클로르헥시딘 처치군과 동일한 성장억제양상을 나타냈으며, 콩기름과 올리브오일은 비록 클로르헥시딘 보다는 못하지만, 미처치한 군보다는 성장을 억제하는 것으로 나타났다( $P<0.001$ ). 처치 후 16시간 시점에서는 오렌지 에센셜오일 처치군의 성장억제양상은 클로르헥시딘에 미치지 못하였으나, 미처치 군보다는 성장이 억제되었다.

이를 통해 오렌지 에센셜오일과 콩기름은 각각 8시간, 4시간까지 클로르헥시딘의 효과에 상응하는 *S. mutans*의 성장 억제 능력을 확인할 수 있었으며, 성장 시간이 지속될수록 식물성오일의 성장에 미치는 영향은 사라지는 것을 확인할 수 있었다(Table 2, Fig. 2).

## 2. *L. casei*에 대한 실험용액 처리 후 성장 영향

*L. casei*에 각 실험용액을 1분 간 처리 후 4시간 후의 흡광도를 관찰한 결과, 미처치대조군에 비해 모든 실험용액 처치군이 통계적으로 유의하게 더 낮게 나타났으며( $P<0.001$ ), 흡광도는 미처치대조군(0.26)에 비해 오렌지 에센셜오일(0.12), 콩기름(0.15), 올리브오일(0.17), 클로르헥시딘(0.21)이 각각 46%, 58%, 65%, 81%로 나타나 오렌지 에센셜오일이 *L. casei*의 성장을 가장 억제하는 것으로 나타났다.

각 실험용액 처리 후 8시간 후 흡광도를 관찰한 결과, 흡광도는 큰 변화를 보이며 증가하였으며, 대조군(0.59)에 비해 오렌지 에센셜오일(0.49)과 콩기름(0.49)만이 통계적으로 유의하게 더 낮게 나타났으며, 미처치대조군에 비해 83%만이 성장하였다.

16시간 후에는 직전 측정시점(4, 8시간)의 각 실험군간 비교양상과는 다른 양상으로 대조군에 비해 콩기름, 올리브오일이 각각 82%, 88%로 나타나고 오렌지 에센셜오일은 그 차이가 나타나지 않았고, 24시간에는 대조군과 식물성오일의 성장의 차이는 나타나지 않았다.

이러한 결과를 통해 식물성오일은 처치 후 초기 시간동안 대조군에 비해 성장을 억제하고, 이후 시간이 지남에 따라 그 효과가 빠르게 사라짐을 알 수 있었다. 또한 클로르헥시딘은 식물성오

**Table 2.** Optical density (620 nm) of *S. mutans* according to the test solution per time (Mean  $\pm$  SD)

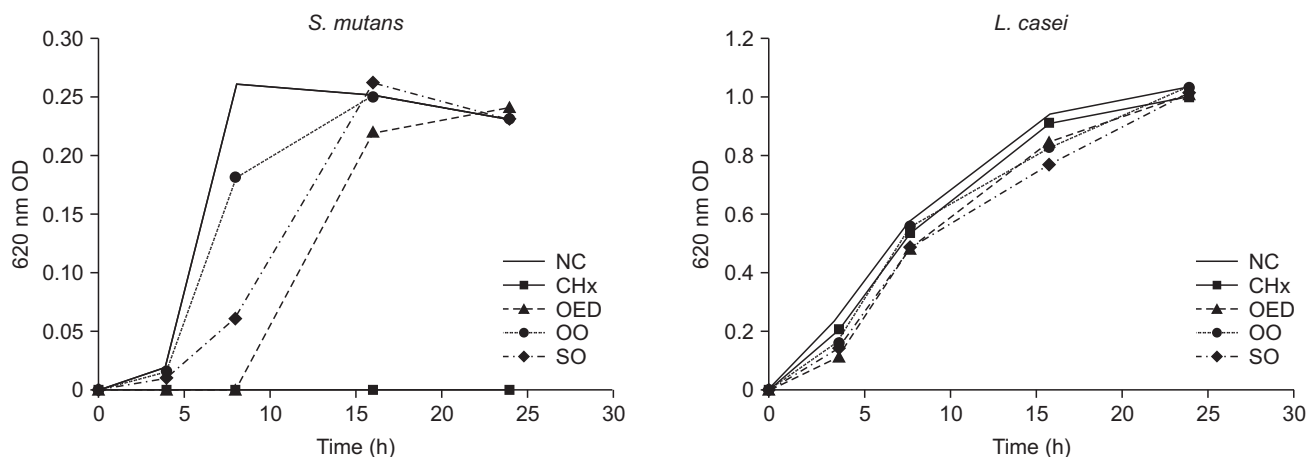
	N	0 h	4 h	8 h	16 h	24 h	P-value <sup>†</sup>
NC	9	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>ba</sup>	0.26 $\pm$ 0.02 <sup>ca</sup>	0.25 $\pm$ 0.01 <sup>ca</sup>	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>da</sup>	$P<0.001$
CHx	9	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup>	0.00 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	$P=0.048$
OEO	9	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.01 <sup>abc</sup>	0.00 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.22 $\pm$ 0.01 <sup>bc</sup>	0.24 $\pm$ 0.01 <sup>ba</sup>	$P<0.001$
OO	9	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0.00 <sup>abd</sup>	0.18 $\pm$ 0.01 <sup>cd</sup>	0.25 $\pm$ 0.01 <sup>da</sup>	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>ea</sup>	$P<0.001$
SO	9	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0.01 <sup>abd</sup>	0.06 $\pm$ 0.01 <sup>bd</sup>	0.26 $\pm$ 0.01 <sup>ca</sup>	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>da</sup>	$P<0.001$
P-value <sup>‡</sup>		$P=1.000$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	

NC: Negative control, CHx: hexamedine solution, OO: olive oil, EO: essential oil, SO: soybean oil.

P-value was determined by nonparametric Kruskal-Wallis test.

<sup>abcde</sup>Indicates difference between measurement time at each group by post hoc Mann-Whitney test.

<sup>ABCD</sup>Indicates difference between groups at each time by post hoc Mann-Whitney test.



**Fig. 2.** The result of growth curve on *S. mutans* and *L. casei* for 0, 4, 8, 16, 24 hours. NC: Negative control, CHx: hexamedine solution, LS: listerine zero, OO: olive oil, OEO: essential oil, SO: soybean oil.



**Table 3.** Optical density (620 nm) of *L. casei* according to the test solution per time (Mean  $\pm$  SD)

	N	0 h	4 h	8 h	16 h	24 h	P-value <sup>†</sup>
NC	9	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.26 $\pm$ 0.01 <sup>bA</sup>	0.59 $\pm$ 0.06 <sup>cA</sup>	0.94 $\pm$ 0.06 <sup>dA</sup>	1.03 $\pm$ 0.03 <sup>eAB</sup>	<i>P</i> < 0.001
CHx	9	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.21 $\pm$ 0.01 <sup>bB</sup>	0.54 $\pm$ 0.08 <sup>cAC</sup>	0.91 $\pm$ 0.08 <sup>dAB</sup>	1.00 $\pm$ 0.01 <sup>dA</sup>	<i>P</i> < 0.001
OEO	9	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.12 $\pm$ 0.02 <sup>bC</sup>	0.49 $\pm$ 0.09 <sup>cBC</sup>	0.85 $\pm$ 0.09 <sup>dACD</sup>	1.01 $\pm$ 0.02 <sup>eAB</sup>	<i>P</i> < 0.001
OO	9	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.03 <sup>bD</sup>	0.56 $\pm$ 0.06 <sup>cAB</sup>	0.83 $\pm$ 0.06 <sup>dB</sup>	1.03 $\pm$ 0.02 <sup>eB</sup>	<i>P</i> < 0.001
SO	9	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.01 <sup>bCD</sup>	0.49 $\pm$ 0.04 <sup>cB</sup>	0.77 $\pm$ 0.04 <sup>dCD</sup>	1.01 $\pm$ 0.01 <sup>eAB</sup>	<i>P</i> < 0.001
P-value <sup>‡</sup>		<i>P</i> = 1.000	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> < 0.05	

NC: Negative control, CHx: hexamedine solution, OO: olive oil, EO: essential oil, SO: soybean oil.

P-value were determined from nonparametric Kruskal-Wallis test.

<sup>†</sup> was evaluated to growth on *L. casei*, <sup>abcde</sup> Denoted by Mann-Whitney U test.

<sup>‡</sup> was performed to compare the optical density between hours, <sup>ABCD</sup> Denoted by Mann-Whitney U test.

일보다 *L. casei*의 성장 억제에 영향을 덜 미치는 것을 확인하였다 (Table 3, Fig. 2).

## 고 안

소득과 교육, 생활 수준이 향상되면서 최근 건강에 대한 국민들의 관심은 점점 더 높아지고 있고, 이러한 관심과 욕구가 TV 및 인터넷, 책 등과 같은 다양한 매체를 통하여 충족되고 있다. 더 나아가 건강에 대한 관심은 구강 질병 예방 및 구강 건강 증진에 대한 관심에까지 이르고 있다<sup>20</sup>. 구강은 다양한 미생물이 서식하는 곳으로 구강질환 및 전신질환이 많이 발생하는 신체 부위 중 하나이며, 구강건강을 향상시키기 위해 미생물의 생육조건을 조절하는 방법이 다양하게 연구되고 개발되고 있다<sup>11</sup>. 최근 약물의 오남용으로 내성균에 대한 문제가 대두되면서 치면세균막 형성을 억제시킬 수 있는 천연물에서 추출한 항균물질 활용에 대한 관심이 높아지고 있다. 따라서, 본 연구에서 대표적인 치아 우식 원인균인 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)와 *Lactobacillus casei* (*L. casei*)에 대한 식물성오일의 성장에 미치는 영향을 평가하고 기존 구강양치용액과 비교하고자 하였다.

본 연구에서는 오일풀링 요법에서 주로 사용되는 식물성 오일인 올리브오일, 시중에 널리 유통되고 있는 대표적인 식물성 오일인 콩기름, 그리고 시중에 유통되는 에센셜 오일 중 임의로 오렌지 에센셜오일을 실험군으로 선정하였으며, 대표적인 항균 구강양치액인 클로르헥시딘 용액과 미처치균(배지용액)과 비교하였다.

*S. mutans*, *L. casei*에 대한 각 실험용액의 1분 간 처치 후 성장 양상은 실험 용액에 따라 다르게 나타났다. 본 연구 결과, *S. mutans*에 대한 성장억제효과는 오렌지에센셜오일, 콩기름, 올리브오일 순으로 나타났으며, 처치 후 8시간에서 미처치균의 *S. mutans* 성장(100%)과 대비하여 오렌지에센셜오일은 0%, 콩기름은 23%, 올리브오일은 69% 성장하였다. 하지만, 처치후 16시간에서는 콩기름과 올리브오일의 성장억제효과는 없었으며 오렌지에센셜오일만이 미약한 성장억제효과(88%)를 나타냈고, 이후 시간에서는 관찰할 수 없었다. *L. casei*에 대한 성장억제효과는 *S. mutans*와 동일한 오렌지에센셜오일, 콩기름, 올리브오일 순으로 나타났으나, 처치 후 4시간에서 미처치균의 성장(100%)와 비교하여 오렌지

에센셜오일은 46%, 콩기름은 58%, 올리브오일은 65% 성장하여, *L. casei*에 대한 식물성오일의 성장 영향은 *S. mutans*보다 적은 것을 알 수 있었다.

본 연구에서 식물성 오일은 *S. mutans*, *L. casei*의 성장에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 오일 고유의 친유성(lipophilicity)은 세포벽과 세포막에 쉽게 결합하여 세포막의 다당류, 지방산, 인지질 구조를 와해시켜 세포의 투과성을 높여 막 손상을 야기하고 세포 내 이온의 소실과 세포막전위의 소실을 야기해 세포독성을 야기할 수 있다<sup>21</sup>. 이러한 오일의 성질이 본 실험 균주의 초기 성장에 영향을 미쳤으며, 오일의 종류와 실험균주의 세포막 특성에 따라 성장 양상이 다르게 나타났을 것으로 여겨진다.

본 연구에서 사용한 식물성 오일 중, 오렌지에센셜오일이 실험 균주에 대한 가장 큰 성장억제 효과를 확인할 수 있었다. 에센셜오일은 오래전부터 각종 세균, 바이러스, 곰팡이균, 기생충, 곤충 등의 감염 방지와 성장억제를 목적으로 사용되어 왔으며, 에센셜오일에 포함된 터펜(Terpenes), 터페노이드(terpenoid), 페놀성 방향 물질 등은 항산화제로 알려져 있다<sup>21</sup>. 치면세균막 구성 균주의 에센셜오일의 다수의 항균효과 연구가 수행되었으며<sup>11,12,22</sup>, 세균의 세포벽을 파괴하여 세포의 효소 활성을 방해하고, 치면세균막 구성 균주 중 그람양성균들의 군집을 막아 치면세균막의 양을 감소시킨다고 알려져 있다<sup>23</sup>. 리스테린은 페놀 구조의 4가지 에센셜오일을 주성분으로 하는 대표적인 항균 구강양치액이다<sup>24</sup>. 본 연구에서 에센셜오일의 고유의 항균력과 오일 특유의 친유성이 다른 식물성오일보다 실험균주의 성장 억제에 더 큰 영향을 미쳤을 것으로 생각된다.

본 연구에서 양성대조군이었던 클로르헥시딘은 *S. mutans*에 대해서는 강력한 성장억제효과를 보인 반면, *L. casei*에 대해서는 성장억제효과를 확인할 수 없었다. 클로르헥시딘은 친수성과 소수성을 모두 갖는 bisbiguanide 계열의 양이온성의 광범위 항균제로 음이온성의 구강세균의 세포벽에 부착하여 세포막을 파괴한다<sup>25</sup>. 고농도에서는 세포의 비가역적 손상을 일으켜 살균(bactericidal) 효과를 나타내며, 저농도에서는 세포기능을 저해하여 정균(bacteriostatic) 효과를 나타낸다고 알려져 있다<sup>26</sup>. 그람음성균보다 그람양성균에 보다 큰 효과를 보는 광범위 항균제로, 실험실 상에서 항균효과보다 임상에서 치면세균막에 대한 항균, 성장저해

효과에 대한 많은 연구가 보고되었다<sup>27,28)</sup>. 실험실 상에서는 주로 *Mutans streptococci* (MS)에 대한 연구가 주로 수행되었으며, 다른 균에 비해 클로르헥시딘이 더 특이적으로 반응하는 것으로 알려져 있으며, *S. mutans*에 대한 최소억제농도는 1-4 µg/ml이다<sup>27)</sup>. 하지만, MS 중에서도 *S. sanguinis*와 같은 일부 종에서 항균력의 변이가 존재하며, MS 이외의 균주에 대해서는 클로르헥시딘의 항균효과는 찾아보기 힘들다. 방사선조사 전후의 대상자에게 클로르헥시딘 사용 후, 치면세균막의 MS와 lactobacilli의 변화를 비교한 임상 연구에서는 MS는 낮은 수준을 유지한 반면, lactobacilli는 양이 지속증가하여 높은 수준을 유지하였다고 보고하였다<sup>29)</sup>. 이러한 선행 연구와 본 연구 결과를 통해 클로르헥시딘은 *Lactobacillus casei*에 대한 항균효과는 없다고 판단되며, 클로르헥시딘보다 식물성 오일이 처치 초기에 *L. casei*의 성장에 더 영향을 미치는 것으로 사료된다. 하지만 Cleghorn 등<sup>30)</sup>은 pH와 클로르헥시딘의 농도에 따라 성장에 영향을 미친다고 보고하였기 때문에 클로르헥시딘의 *L. casei*에 대한 영향에 관한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

본 연구에서는 치아우식증의 대표적인 원인균인 *S. mutans*와 *L. casei*에 대한 식물성 오일의 성장억제효과를 실험적으로 평가하였지만, 식물성오일을 이용한 오일풀링의 구강내 주효과는 치은염 완화로 알려져 있다<sup>17)</sup>. 향후 연구에서는 치주질환 원인균에 대한 영향을 평가하고, 식물성 오일의 세균에 대한 직접적인 영향을 확인하기 위하여 투과 전자현미경(Transmission Electron Microscope) 등을 통한 세포벽 변화를 관찰하는 연구가 필요할 것이다. 또한 이러한 실험실 연구결과를 바탕으로 실제 식물성오일 양치 후, 세균 조성의 변화와 치은염 완화 효과를 평가하는 임상연구가 수행될 필요가 있다.

## 결론

본 연구는 식물성오일의 구강양치가 구강세균에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 대표적인 치아우식 유발 균주인 *Streptococcus mutans*와 *Lactobacillus casei*를 실험실 상에서 배양한 후, 오렌지에센셜오일, 올리브오일, 콩기름을 1분 동안 노출시킨 후, 0, 4, 8, 16, 24시간 후에 흡광도 평가를 통해 성장을 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *Streptococcus mutans*에 대하여 식물성 오일은 성장억제효과를 나타냈으며, 오렌지에센셜오일>콩기름>올리브오일 순으로 성장억제효과가 있었다.

2. 오렌지에센셜오일과 콩기름은 각각 8시간, 4시간까지 클로르헥시딘의 효과에 상응하는 *S. mutans*의 성장 억제 능력을 나타냈다.

3. *Lactobacillus casei*에 대하여 식물성오일은 4시간까지 대조군에 비해 유의한 성장억제효과를 나타냈으며, 오렌지에센셜오일이 가장 큰 효과를 나타냈다.

4. 식물성오일은 클로르헥시딘보다 *Lactobacillus casei*에 대해 처치후 4시간까지 성장억제효과가 크게 나타났다.

본 실험실 연구를 통해 식물성 오일이 *Streptococcus mutans*

와 *Lactobacillus casei*에 대한 성장억제효과가 있음을 확인하였으며, 올리브오일, 콩기름보다 오렌지에센셜오일이 가장 큰 성장억제효과가 있음을 확인하였다. 이러한 연구결과를 바탕으로 추후 연구를 통해 식물성 오일의 구강세균 성장억제 기전 및 임상에서의 치면세균막의 성장억제에 관한 연구가 필요할 것이다.

## References

- Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol* 2000 2006;42:80-87.
- Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986 50:353-380.
- Song YJ. Classification of Periodontal Pathogens Based on Genetic Specificity[master's thesis]. Seoul: Seoul National University;2014. [Korean]
- Listgarten MA. The structure of dental plaque. *Periodontol* 2000, 1994;5:52-65.
- Kim EJ. Study on the reduction effects on oral microorganisms through the different methods of controlling dental plaque[master's thesis]Seoul:Dankook University;2003. [Korean]
- Filoché SK, Soma K, Sissons CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:221-225.
- Palombo EA. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011;2011:1-15.
- Trahan L. Xylitol: a review of its action on *mutans streptococci* and dental plaque-its clinical significance. *Int Dent J* 1995;45:77-92.
- Hwang JK, Shim JS, Baek NI, Pyun YR. Xanthorrhizol: a potential antibacterial agent from *Curcuma xanthorrhiza* against *Streptococcus mutans*. *Planta Med* 2000;66:196-197.
- Baratta MT, Dorman HJ, Deans SG, Figueiredo AC, Barroso JG, Ruberto G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour Fragr J* 1998;13:235-244.
- Lee SY, Kim JK, Baek BJ, Yang YM, Lee KY, Lee YH, et al. Antibacterial effect of essential oils on oral bacteria. *J Korean Acad Pediatr Dent* 2009;36:1-11.
- Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:61-64.
- Lim DJ. Extraction of natural citrus by SC-CO<sub>2</sub> and their pharmacological effect on aroma therapy[doctor of philosophy] Busan:Pukyong National University;2014.[Korean]
- Fife B. Oil pulling therapy : detoxifying and healing the body through oral cleansing. Seoul:Piccadilly Books;2013:274-280.
- Tomar P, Hongal S, Jain M, Rana K, Saxena V. Oil Pulling and Oral Health: A Review. *IJSS* 2014;1:33-37.
- Asokan S, Rathana J, Muthu MS, Rathana PV, Emmadi P, Raghuraman, et al. Effect of oil pulling on *Streptococcus mutans* count in plaque and saliva using Dentocult SM Strip mutans test: a randomized, controlled, triple-blind study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2008;26:12-17.
- Amith HV, Ankola AV, Nagesh L. Effect of oil pulling on plaque and gingivitis. *J Oral Health Comm Dent* 2007;1:12-18.
- Kim JH. Anticidant and antimicrobial effects of lemon and eucalyptus essential oils[master's thesis]. Seoul: Konkuk University;2011. [Korean]
- Kang SM. Effect of essential oil mouthrinse on oral squamous epithelial cells (KB Cells)[master's thesis]. Seoul: Chung-ang Univer-

- sity;2010. [Korean]
20. Kim SH, Lim SA, Park SJ, Kim DK. Assessment oral Health-related quality of life using the Oral Health Impact Profile(OHIP). *J Korean Acad Oral Health* 2004;28:559-569.
  21. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils-a review. *Food Chem Toxicol* 2008;46:446-475.
  22. Shapiro S, Meier A, Guggenheim B. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 1994;9:202-208.
  23. Ouhayoun JP. Penetrating the plaque biofilm: impact of essential oil mouthwash. *J Clin Periodontol* 2003;30:10-12.
  24. Charles CH, Mostler KM, Bartels LL, Mankodi SM. Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. *J Clin Periodontol* 2004 Oct;31(10):878-84.
  25. Scheie AA, Rukke HV, Perterson FC. Are antibacterials necessary in caries prophylaxis? In: Fejerskov O, Nyvad B, Kidd E. *Dental caries: the disease and its clinical management*. 3rd ed. Oxford: Wiley Blackwell; 2015:287-301.
  26. Hugo WB, Longworth AR. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *J Pharm Pharmacol* 1964;16:655-662.
  27. Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res* 1977;85:255-265.
  28. Emilson CG. Outlook for Hibitane in dental caries. *J Clin Periodontol* 1977 Dec;4:136-143.
  29. Joyston-Bechal S, Hayes K, Davenport ES, Hardie JM. Caries incidence, mutans streptococci and lactobacilli in irradiated patients during a 12-month preventive programme using chlorhexidine and fluoride. *Caries Res* 1992;26:384-390.
  30. Cleghorn B, Bowden GH. The effect of pH on the sensitivity of species of *Lactobacillus* to chlorhexidine and the antibiotics minocycline and spiramycin. *J Dent Res* 1989;68:1146-1150.